

Schwerpunktpraktikum Pharmakologie

T-Zellaktivierung

1	ZUSAMMENFASSUNG	3
2	THEORIE	3
2.1	T-Zellen	3
2.2	Tumor-Nekrose-Faktor (TNF)	3
2.3	MHC (major histocompatibility complex, Histokompatibilitäts-Antigene)	4
2.4	Phorbol ester	4
2.5	Dexamethason	4
2.6	Der TCR-Komplex	4
2.7	Anfärben der toten Zellen durch Trypanblau	5
3	DURCHFÜHRUNG	5
3.1	Durchführung zur Bestimmung des TNF-Gehaltes:	6
3.2	Induktion der Proliferation (ConA, TPA, TPA+Ionomycin und OKT3)	7
4	ERGEBNISSE DER PROLIFERATIONSMESSUNG (ERGEBNISSE DER TNF-BESTIMMUNG SIEHE TNF-PROTOKOLL!)	7
5	DISKUSSION	8

1 Zusammenfassung

Ziel des Versuchs ist es mononukleäre Zellen, nämlich periphere Blutlymphozyten und Monozyten aus dem menschlichen Blut zu isolieren und die Induktion der T-Zellen-Proliferation in ruhenden Lymphozyten durch Concanavalin A (ConA), Phorbol ester (PMA bzw. TPA), Iononmycin und durch monoklonale Antikörper (OKT3) gegen den T-Zell-Rezeptor/CD3-Komplex zu untersuchen.

Zum anderen sollen die T-Zellen in verschiedenen Ansätzen mit den Aktivatoren Concanavalin A (ConA) und bakteriellem Lipopolysachharid aus E.coli (LPS) behandelt und der Tumor-Nekrose-Faktor (TNF) bestimmt werden. Die Ergebnisse aus der TNF-Bestimmung werden im Protokoll "Tumor-Nekrose-Faktor" präsentiert.

Zur Hemmung der Zytokin-Synthese wird das Glucocorticoid Dexamethason eingesetzt und die Wirkung mit Hilfe eines Bioassays untersucht.

2 Theorie

2.1 T-Zellen

Man kann grob zwei Arten von T-Zellen unterscheiden. Zum einen greifen zytotoxische T-Zellen durch Keime parasitierte Zellen an, indem sie eine Signalkaskade einleiten deren Resultat eine apoptotische Reaktion der betroffenen Zielzelle ist (s. auch Tumor-Nekrose-Faktor (TNF)) und zum anderen setzen die sogenannten T-Helferzellen Mediatoren wie Zytokine, Interleukine und Lymphokine frei und erreichen somit, daß eine Immunantwort auf Keime eingeleitet wird. Dabei stehen nicht wie bei den zytotoxischen T-Zellen intrazelluläre Parasiten, sondern vielmehr außerhalb der Zellen vorkommende pathogene Organismen im Vordergrund.

Die Beobachtung der T-Zellaktivierung in vitro ist aufgrund des geringen Bruchteils an Lymphozyten, die ein bestimmtes Antigen erkennen nicht einfach.

Zur Verbesserung der Detektierbarkeit werden daher Substanzen verwendet, die eine polyklonale Aktivierung auslösen und somit eine große Zahl an Zellen aktivieren. Substanzen die solche polyklonalen Aktivierungen auslösen ordnet man entweder der Klasse der polyklonalen Mitogene oder der Klasse der Superantigene zu. Zu der ersten Klasse wird das hier verwendete ConA gezählt. Zu den Superantigenen rechnet man dagegen bakterielle Endogene.

2.2 Tumor-Nekrose-Faktor (TNF)

TNF- α ist die Bezeichnung für ein körpereigenes, als Monokin in Makrophagen bei Einwirkung von Endotoxin gebildetes, jedoch auch von aktivierten Mastzellen ausgeschüttetes, in vivo trimeres Protein.

Die Hauptaufgabe des Tumor-Nekrose-Faktors (TNF) ist nicht das Tumor-Zellen-Killing. Er ist gleichzeitig ein zytokintypischer Mediator bei Entzündungen, indem er die Makrophagen und Leukocyten des Immunsystems aktiviert und die Synthese für Entzündungen charakteristischer sogenannter Akutphasen-Proteine induziert. TNF- α wirkt – synergistisch mit Interferon γ - antiviral, schützt im Tierversuch gegen Malaria, und ist in der Lage, manche Tumoren zu zerstören, ohne gesundes Gewebe zu schädigen, indem er bei den Zielzellen apoptotische Reaktionen einleitet. Andererseits besitzt er nachteilige Nebenwirkungen wie

Veränderungen der Eigenschaften des Gefäß-Endothels, massiver Körpergewichtsverlust, Fieber und toxischer Schock.

Über eine Aktivierung der von NFκB kontrollierten Gene fördert TNF weiterhin die Proliferation.

2.3 MHC (major histocompatibility complex, Histokompatibilitäts-Antigene)

MHC ist die Bezeichnung für bestimmte, in den Membranen tierischer Zellen gebundene Glykoproteine, die unter anderem für die Histokompatibilität verantwortlich sind, das heißt für die Verträglichkeit bzw. Unverträglichkeit (Inkompatibilität) eigenen Gewebes mit fremdem Gewebe, z.B. bei Transplantationen und Implantationen. Als typische Antigene können die Histokompatibilitäts-Antigene in einem Organismus die Bildung von Antikörpern und damit eine Antigen-Antikörper-Reaktion (AAR) hervorrufen.

Die Histokompatibilitäts-Antigene der Klasse 1 kommen zwar – assoziiert mit dem nicht im MHC codierten β₂-Mikroglobulin – in den Membranen aller kernhaltigen Körperzellen vor, diejenigen der Klasse 2 (2 variable Polypeptidketten: α und β; beide im MHC kodiert; oft mit invarianten Membranproteinen assoziiert, deren Gene nicht dem MHC angehören) sind jedoch auf die Leukocyten-, insbesondere die Lymphocyten-Membranen beschränkt. Diese Proteine der Klassen 1 und 2 spielen im Immunsystem eine wichtige Rolle, indem sie bei einer zellulären Immunantwort von sogenannten Antigen-präsentierenden Zellen zusammen mit Spaltstücken des Fremd-Antigens dem Antigen-Rezeptor eines T-Lymphocyten dargeboten werden müssen .

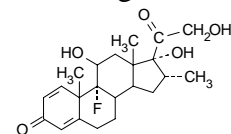
2.4 Phorbolster

Phorbolster sind schwer metabolisierbare sehr potente Cocarcinogene (Tumor-Promotoren), die ohne das Vorliegen bereits irreversibel veränderter (initiiertes) Zellen keine Tumoren erzeugen können. Ihre Wirkung besteht darin, daß sie die Proteinkinase C, die Tyrosin-Reste phosphoryliert, langfristig aktivieren . Phorbolster können auch das Epstein-Barr-Virus zur Vermehrung anregen.

2.5 Dexamethason

Dexamethason zählt zu der Gruppe der Glucocorticoide. Es wird als Pharmakon aufgrund seiner antiinflammatorischen Wirkung eingesetzt. Diese entzündungshemmende Eigenschaft wird über den folgenden komplizierten Wirkmechanismus erzielt:

Dexamethason diffundiert durch die Zellmembran ins Cytoplasma. Dort bindet es an seinen physiologischen Rezeptor und wird als Wirkstoff-Rezeptor-Komplex in den Kern transportiert, wo es dann regulierend auf den Transkriptionsfaktor NFκB einwirkt und die Synthese von Entzündungsmediatoren und die Expression der NO-Synthase hemmt.

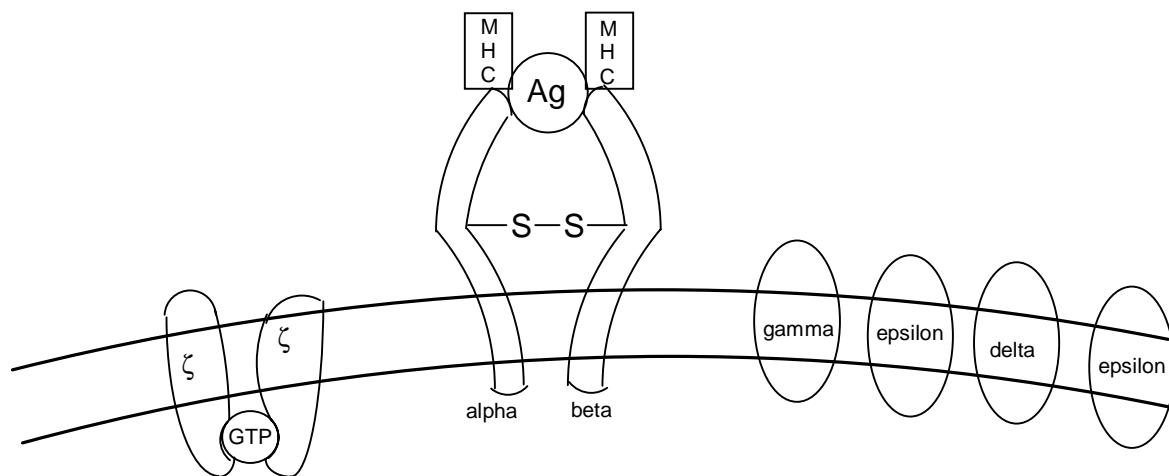


2.6 Der TCR-Komplex

Der TCR-Komplex spielt eine entscheidende Rolle bei der Aktivierung von T-Lymphocyten. So bietet er durch seine Struktur der T-Zelle die Möglichkeit durch eine Zell-Zell-Interaktion mit anderen Zellen aktiviert zu werden.

Zu diesem Zwecke ist als zentrale Rezeptoreinheit die membrangebundene Organisation zweier durch eine Disulfid-Brücke verbundenen Peptidketten (α und β-Kette) von Bedeutung. Diese als TCR-α-β-Heterodimer bezeichnete Struktur ermöglicht es den T-Zellen Peptidantigene, die an die MHC-Moleküle gebunden sind zu erkennen. Die Aktivierung und

die Oberflächen-Expression einer akzessorischen (antigenpräsentierenden) Zelle ist jedoch nicht nur abhängig von diesem Heterodimer. Es spielen in den meisten TCR-Komplexen insgesamt mindestens vier bis fünf andere Proteine, die nicht kovalent mit dem α - β -Heterodimer assoziiert sind eine Rolle.



Die Abbildung zeigt schematisch den funktionellen TCR-Komplex.

Drei der Bestandteile dieses Komplexes bezeichnet man als CD3-Proteine. Sie beinhalten eine 25 bis 28 kD schwere glykosylierte γ -Kette, eine 20 kD schwere glykosylierte δ -Kette und eine 20 kD schwere, nicht-glykosylierte ϵ -Kette. Des Weiteren enthalten 90 Prozent der TCR-Komplexe ein Heterodimer einer 16 kD schweren nicht-glykosylierten ζ -Kette. Das heißt, die minimale Stöchiometrie der häufigsten TCR-Komplexe ist $\alpha\beta:\gamma\delta\epsilon\zeta_2$.

2.7 Anfärben der toten Zellen durch Trypanblau

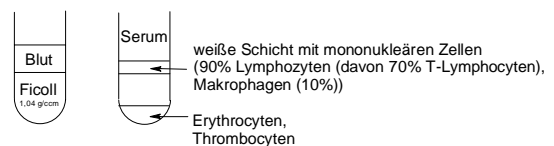
Tote Zellen lassen sich einfach durch Anfärbung mit Trypanblau-Lösung sichtbar machen. Man macht sich dabei das Prinzip zu Nutze, daß lebende Zellen den Farbstoff wieder an ihre Umgebung aktiv abgeben. Tote Zellen haben diese Fähigkeit jedoch nicht. Unter dem Lichtmikroskop lassen sich also die Toten Zellen einfach anhand ihrer Blaufärbung von den lebenden unterscheiden.

3 Durchführung

Die Durchführung ist genau im Praktikumsskript beschrieben. Hier soll lediglich ein Überblick über die durchgeführte Arbeit präsentiert werden:

Zur Isolierung der humanen Lymphozyten aus dem heparinisierten Blut werden in einem Zentrifugenbecher 20 ml Ficoll-Isopaque-Gemisch mit 30 ml Blut überschichtet und für 20 Minuten bei 2000 rpm (=1000 g) zentrifugiert. Es bildet sich zwischen dem Serum und den pelletierten Erythrozyten und Thrombozyten eine weiße Schicht aus, die die mononukleären Zellen enthält.

Das Serum wird bis auf einen Zentimeter abgezogen und die weiße Schicht, die aus den Lymphozyten und 10-15% Monozyten besteht, steril abgesammelt. Die Zellen werden mit dem



vierfachen Volumen an RPMI (ohne FKS) verdünnt und 10 Minuten bei 1600 rpm abzentrifugiert und danach in 2 ml RPMI (20% FKS) aufgenommen und gezählt.

Die Zellzahl wird auf 4×10^6 Zellen/ml eingestellt. Mit einer Trypanblau-Lösung wird das Verhältnis von toten Zellen an der Gesamtzellzahl bestimmt.

Zur T-Zellaktivierung werden die folgenden Lösungen an verschiedenen Aktivatoren und Dexamethason hergestellt:

Lösung 1:

Concanavalin A (Con A): Stammlösung: 1 mg/ml

Verdünnung: 100 µg/ml mit RPMI ohne FKS

Lösung 2:

Phorbol-Myristat-Acetat (PMA oder TPA): Stammlösung 1 mg/ml

Verdünnung: 100 ng/ml mit RPMI

Lösung 3:

Ionomycin: Stammlösung 5 mg/ml in DMSO

Verdünnung 5 µg/ml mit RPMI

Lösung 4:

OKT3 (Monoklonaler Antikörper gegen die ε-Kette des t-Zell-Rezeptor/CD3-Komplexes)

Stammlösung: 1 mg/ml

Verdünnungen:

1) 50 µg/ml mit RPMI ohne FKS

2) 10 µg/ml mit RPMI ohne FKS

3) 1 µg/ml mit RPMI ohne FKS

4) 100 ng/ml mit RPMI ohne FKS

5) 50 ng/ml mit RPMI ohne FKS

Lösung 5 :

LPS (bakterielles Lipopolysaccharid aus E.coli): Stammlösung: 5 mg/ml

Verdünnung: 1 µg (entspricht 1000 ng/ml)

Lösung 6:

Dexamethason: Stammlösung 8,6 mM

Verdünnung 10 µM

Lösung 7:

Lösungsmittelkontrolle von DMSO

3.1 Durchführung zur Bestimmung des TNF-Gehaltes:

Zur Herstellung von TNF-haltigen Überständen und zur Kontrolle in welchem Umfang Dexamethason wirkt werden folgende Ansätze hergestellt:

Ansatz A	Ansatz B	Ansatz C	Ansatz D	Ansatz E
800 µl Zellen (4 x 10 ⁶ /ml)	800 µl Zellen (4 x 10 ⁶ /ml)	800 µl Zellen (4 x 10 ⁶ /ml)	800 µl Zellen (4 x 10 ⁶ /ml)	800 µl Zellen (4 x 10 ⁶ /ml)
200 µl Lösung 8			100 µl Lösung 6	100 µl Lösung 6
Vorinkubation: 1 Stunde bei 37°C in einem CO₂-begasteten Brutschrank, dann Zugabe von				
	100 µl Lösung 1	100µl Lösung 5	100 µl Lösung 1	100 µl Lösung 5

Die Ansätze werden bei 37 °C für 20 Stunden inkubiert und die Zellen abzentrifugiert. Die Überstände sind jetzt TNF-haltig und werden abgenommen.

Die TNF-Konzentration wird im Bioassay (siehe TNF-Protokoll) nachgewiesen.

3.2 Induktion der Proliferation (ConA, TPA, TPA+Ionomycin und OKT3)

Die Proliferation der Lymphozyten wird durch den Einbau von radioaktivem ^3H -Thymidin-Einbau in die DNA verfolgt.

Dazu werden die folgenden Dreifach-Ansätze angelegt:

A	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
B	Kontrollansatz			20 $\mu\text{g/ml}$ ConA			20 $\text{ng}/\mu\text{l}$ TPA			20 $\text{ng}/\mu\text{l}$ TPA + 1 $\mu\text{g/ml}$ Ionomycin		
C	DMSO Verd. 1:1000			OKT 10 $\mu\text{g/ml}$			OKT 2 $\mu\text{g/ml}$			OKT 0,2 $\mu\text{g/ml}$		
D	OKT 20 ng/ml			OKT 10 ng/ml			Kontrollansatz					

Die Ansätze werden für 72 Stunden bei 37°C inkubiert und danach mit 20 μl ^3H -Thymidin (25 $\mu\text{Ci/ml}$, 5 Ci/mmol) je Probe versetzt.

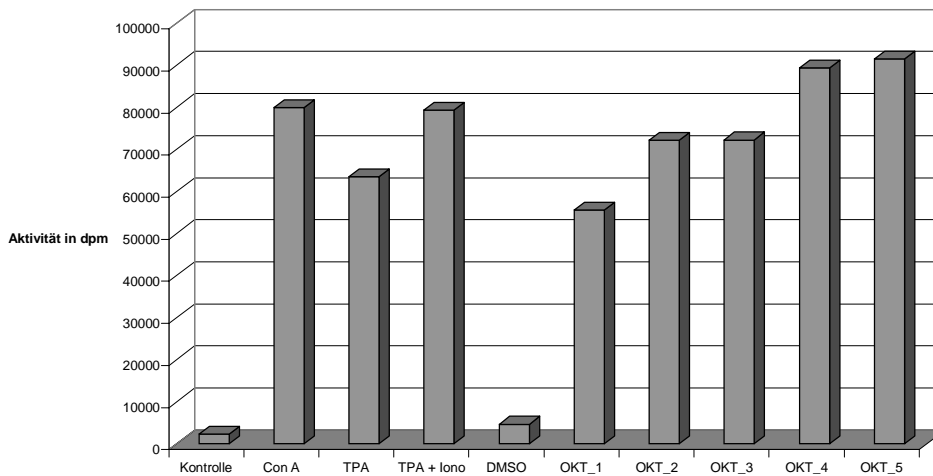
Zur Messung der Aktivität werden die Proben in einem halbautomatischen Probensammler geerntet und die hochmolekulare DNA auf ein Glasfilterpapier gesaugt. Das nicht umgesetzte Thymidin wird gewaschen. Das DNA-haltige Filterpapier wird für 30 Minuten in einem Trockenschrank bei 110°C getrocknet, die ausgestanzten Bezirke mit 1 ml Emulsifier-Safe-Szintillator in ein Szintillationsröhrchen gegeben und die Aktivität gemessen.

4 Ergebnisse der Proliferationsmessung (Ergebnisse der TNF-Bestimmung siehe TNF-Protokoll!)

Die Auswertung durch den Szintillationszähler liefert folgende Aktivitäten:

Probe	Aktivität in dpm
Kontrolle	2248,2
Con A	79968
TPA	63434,3
TPA + Iono	79259,9
DMSO	4652,1
OKT3_1	55600,7
OKT3_2	72200,7
OKT3_3	72216
OKT3_4	89335,2
OKT3_5	91453,5
Kontrolle	33143

Bestimmung der Proliferation über den Tritium-Einbau in Thymidin



(Der Original-Meßstreifen ist dem Protokoll als Anhang beigefügt)

Die Kontrolle zeigt eine Aktivität von 2248,2 dpm, während die mit ConA, TPA und TPA + Ionomycin stimulierten Proben um den Faktor 30 bis 40 höhere Aktivitäten besitzen.

Die Ansätze, die mit ConA behandelt wurden, weisen eine um 20% höhere Proliferation auf als die Proben, die mit TPA induziert wurden. Die Zugabe von Ionomycin erhöht die Zellproliferation gegenüber der Induktion durch TPA noch einmal um 20%.

Die Proben, denen der monoklonale Antikörper OKT3 zur Induktion zugesetzt wurde, zeigen mit abnehmender Antikörper-Konzentration zunehmende Aktivität.

Die Aktivitäten aller stimulierten Proben liegt im Bereich von 60000 bis 90000 dpm.

5 Diskussion

Tendenziell liefert das Experiment die erwarteten Ergebnisse. Die Aktivitäten der stimulierten Proben, die deutlich stärker proliferieren als der unstimulierte Kontrollansatz (Faktor 30 bis 40), zeigen, daß die Lymphozyten aus dem humanen Blut vor Beginn des Experimentes nicht aktiv waren, was theoretisch durch einen Infekt hätte verursacht werden könnte. Um eine Infektion von Keimen auszuschließen ist also das Mitführen der Kontrolle zwingend notwendig.

Die durch ConA stimulierten Zellen zeigen zwar eine um 20% höhere Aktivität als der durch TPA induzierte Ansatz, jedoch erreichen sie nicht die erwartete doppelt so hohe Proliferationsrate.

Die Zugabe von Ionomycin zu den TPA-stimulierten Zellen führt zu einer Erhöhung der intrazellulären Calcium-Konzentration und erhöht somit die Proliferationsrate der T-Zellen gegenüber dem ionomycinfreien TPA-Ansatz um 20%.

Die Zugabe des Antikörpers OKT3 zu den Zellen induziert die Proliferation, jedoch scheinen geringere Konzentrationen einen erhöhten Effekt zu erzielen. Die Aufnahme einer Dosis-Wirkungskurve liefert jedoch kein sinnvolles Ergebnis, da die Zugabe der geringsten Antikörpermenge zur größten Wirkung führen würde. Dieses unbefriedigende Ergebnis läßt sich dadurch erklären, daß der Antikörper schon in Konzentrationen vorliegt, die sich im Bereich der gesättigten Ansätze bewegen. Würde man geringere Antikörperkonzentrationen

wählen, so würde sich vermutlich eine sinnvolle Dosis-Wirkungskurve aus den Messungen ableiten lassen.